Литература

1. Верёвкин А.И. Доклад совещанию ветеринарных врачей и представителей земства в 1901 г. Постановления его и судьба этих постановлений // Труды III совещания представителей земств и ветеринарных врачей Воронежской губернии 16 – 22 августа 1908 г. – Воронеж, 1908. – С. 7-24.

2. Верёвкин А.И. Доклад: «Обзор работы III совещания 1908 г. Постановления этого совещания и судьба этих постановлений» // Труды IV совещания представителей земств и ветеринарных врачей Воронежской губернии 6 – 11 августа 1911 г. – Воронеж, 1911. – С. 15-31.

3. Ветеринарно-лечебная деятельность // Отчёт о состоянии ветеринарного дела в губернии и о деятельности ветеринарного персонала губернского земства за 1916 г. Ветеринарный отдел Воронежской губернской земской управы. – Воронеж, 1917. – С. 126-130.

4. Журналы Коротоякского очередного уездного земского собрания [Текст] / Доклад о ветеринарной части // Сессия, 1912. – Коротояк: типография «Печатный труд», 1913. – С. 534-550.

5. Журналы Воронежского губернского земского собрания [Текст] / Доклад по вопросам ветеринарно-фельдшерской школы // Очередная сессия, 1915 (15-24 января 1916). – Воронеж, 1916. – С. 1-8.

6. Организация ветеринарно-врачебной помощи / Доклад комиссии совещанию ветеринарных врачей // Журналы Воронежского губернского земского собрания. Очередной сессии 3-20 декабря 1899 и Чрезвычайной сессии 28-30 января 1900. – Воронеж, 1900. – С. 8-11.

7. Пацевич Б. Ветеринарно-врачебная деятельность в Воронежской губернии // Вестник общественной ветеринарии № 2. – 1900. – С. 75-77. (Журнал).

8. Первый отчёт по ветеринарно-фельдшерской школе Воронежского губернского земства за 1912-1913 учебный год [Текст] / Воронеж: «Н. Кравцов и Ко», 1913. – 46 с.

9. Скворцов В.Н. Становление земской ветеринарии в Воронежской губернии [Текст] // Материалы международной конференции «Теоретические и практические аспекты возникновения и развития болезней животных и защита их здоровья в современных условиях», посвящённой 30-летию Всероссийского научно-исследовательского института патологии, фармакологии и терапии. Воронеж, 3-4 октября 2000. – С. 104-107.

10. Скворцов В.Н., Буханов В.Д., Балбуцкая А.А. История образования Воронежской губернской земской ветеринарно-бактериологической лаборатории, предшественницы ГНУ ВНИВИПФиТ // Материалы международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы болезней обмена веществ у сельскохозяйственных животных в современных условиях», посвящённой 40-летию ГНУ ВНИВИПФиТ. – Воронеж, 2010. – С. 211-215.

11. Шадрин Н.А. К вопросу о направлении земской ветеринарии // Ветеринарное обозрение, 1899. – С. 47-51.

12. Шадрин Н.А. Итоги земской ветеринарии (1864-1905) // Ветеринарное обозрение, 1909. № 1. – С. 145-160.

13. Шадрин Н.А. Итоги земской ветеринарии (1864-1905) (окончание) / Деятельность и учреждения земской ветеринарии // Ветеринарное обозрение, 1909. № 9-10. – С. 269-274.

Контактная информации об авторах для переписки

Владимир Дмитриевич Буханов, к. вет. н., доцент, ведущий научный сотрудник Белгородского отела Всероссийского научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко. Адрес: Россия, 308002 г. Белгород, ул. Курская, 4. Тел. 8 (4722) 26-29-75. e-mail: veter@belnet.ru

Владимир Николаевич Скворцов, д. вет. н., зав. Белгородским отелом Всероссийского научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко. Адрес: Россия, 308002 г. Белгород, ул. Курская, 4. Тел. 8-4722-26-29-75. e-mail: veter@belnet.ru

Ольга Владимировна Стопкевич – соискатель Белгородского отдела ВИЭВ. Адрес: Россия, 308002 г. Белгород, ул. Курская, 4. Тел. 8 (4722) 26-29-75. e-mail: veter@belnet.ru

Никулин Иван Алексеевич, доктор ветеринарных наук, профессор, Воронежский ГАУ

УДК 619: 579.852.13+57.086.2

Сальникова М.М., Саитов В.Р., Рахматуллин И.Ф., Хузин Д.А., Макаев Х.Н.

(Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности, г. Казань)

УЛЬТРАТОНКОЕ СТРОЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ НЕКРОБАКТЕРИОЗА FUSOBACTERIUM NECROPHORUM

Ключевые слова: электронная микроскопия, метод ультратонких срезов, негативное контрастирование, некробактериоз, Fusobacterium necrophorum.

Некробактериоз – широко распространенное во всем мире инфекционное заболевание, вызываемое видом Fusobacterium necrophorum. Опасность некробактериоз

представляет для крупного рогатого скота, северных оленей, в то же время к этому заболеванию восприимчивы и многие виды домашних и диких животных, человек. Некробактериоз является существенной причиной экономического ущерба в скотоводстве.

Возбудитель заболевания Fusobacterium necrophorum, относится к грамотрицательным, неспорообразующим, анаэробным бактериям семейства Bacteroidaceae. Данные об ультраструктурной организации F. necrophorum немногочисленны. Цель настоящего исследования: изучить ультраструктурную организацию двух штаммов фузобактерий для дальнейшего изучения действия антибактериальных препаратов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для электронно-микроскопических исследований были выбраны штаммы Fusobacterium necrophorum, выделенные из неблагополучных по некробактериозу хозяйств: «8TS630501» и «12TSK630501», депонированные в ГНЦ ВБ «Вектор», НИИ ККМ, имеющие известные генетические маркеры: белка оболочки (гроВ), гемагглютинина, ДНК-гиразы и транспоназы. Были использованы 24 часовые культуры этих штаммов, выращенных в жидкой питательной среде на основе ФГПЭМ (ферментативной гидролизат-плацентарной эмбриональной массы) с добавлением 0,5% глюкозы и 10% нормальной сыворотки крупного рогатого скота.

Для исследования ультратонкой организации F. necrophorum были применены методы негативного контрастирования и ультратонких срезов.

Метод негативного контрастирования (НК). Каплю исследуемой баксуспензии наносили на медные сетки, покрытые формваровой пленкой, контрастировали 2% водным раствором уранилацетата 1 минуту при комнатной температуре, промывали дистиллированной водой, просушивали и просматривали на электронном микроскопе JEM 100CX-2 («Jeol» Japan).

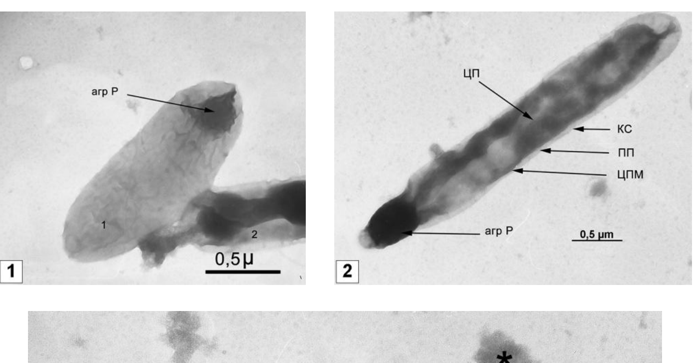
Метод ультратонких срезов. Осадок культуры, полученный центрифугированием при 5000 об/мин в течение 15 мин. трижды промывали физиологическим раствором среды и заключали в агар-агар. Кусочки заключенной в агар-агар культуры фиксировали 1% раствором глутарового альдегида (SERVA, Германия) на 0,1 М фосфатном буфере рН 7,4 в течение 12 часов в холодильнике с последующей фиксацией в 2% растворе четырехокиси осмия (Московский химзавод) на том же буфере в течение 2 часов при комнатной температуре. После дегидратации образцы заключали в смесь эпоновых (Epon-812, MNA, DDSA) смол (SERVA, Германия). Ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме LKB–3 и изучали в электронном микроскопе JEM 100CX-2 («Jeol» Japan). Съемку проводили на фототехническую пленку AGFA ORTHOCHROMATIC. Для получения микрофотографий негативы сканировали на сканере EPSON PERFECTION 4990 PHOTO с разрешением 600 dpi.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При исследовании образцов по методу НК клетки фузобактерий имеют палочковидную форму (рис. 1-3). Размер клеток штамма «8TS630501» варьирует от 0,3 до 0,67 мкм по ширине и от 1,25 до 14,1 мкм по длине, а штамма «12TSK630501» - от 0,58 до 0,67 мкм по ширине и от 1,85 до 5,56 мкм по длине. На снимках были обнаружены гантелевидные делящиеся бактерии, в которых хорошо просматривалась перетяжка (рис. 11).

Строение клеточной стенки (КС) и плазматической мембраны (ПМ). Электронно-микроскопические исследования обоих штаммов фузобактерий показали гладкую поверхность КС, жгутики и пили не обнаруживались. На ультратонких срезах (рис. 4) просматривается извилистая многослойная КС и ЦМ. Между КС и плазмалеммой имеется периплазматическое пространство. Отличий в строении КС и ЦМ у двух изученных штаммов не обнаружено. Толщина ЦМ составляет 7,5 – 8,5 нм, контуры ее не повторяют извилистости наружной мембраны. На наружной поверхности КС выявлен аморфный материал средней электронной плотности. Под наружной мембраной находится пластинчатый внутренний ригидный слой КС, образованный пептидогликанами. Общая толщина слоев КС составляет 24 - 35 нм.

Периплазматическое пространство (ПП). фузобактерий исследованных штаммов имеет непостоянную толщину и состав различной плотности. У некоторых клеток ПП располагается относительно ровной лентой (шириной 30 - 45 нм) между внутренней и наружной мембранами, содержит материал электронно-прозрачный или гомогенный средней электронной плотности (рис. 4). В отдельных точках наблюдается примыкание цитоплазматической мембраны к клеточной стенке. На ультратонких срезах и на препаратах



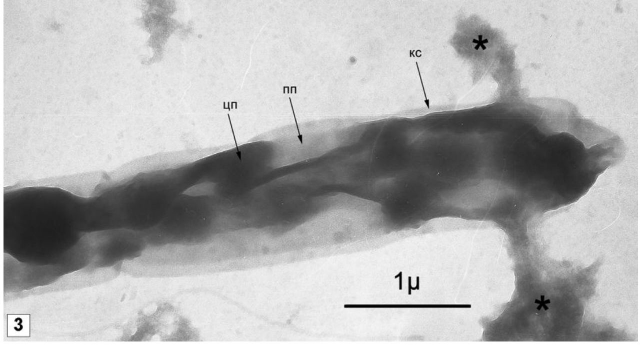


Рис. 1-3. Метод негативного контрастирования.

Рис. 1. Штамм «8TS630501». 1-Одиночная клетка, 2-участок клетки с измененным протопластом.

Рис. 2. Штамм «12TSK630501». Одиночная клетка.

Рис. 3. Штамм «8TS630501». Участок клетки с измененным периплазматическим пространством. Выделение токсинов (обозначено звездочкой) в окружающую среду.

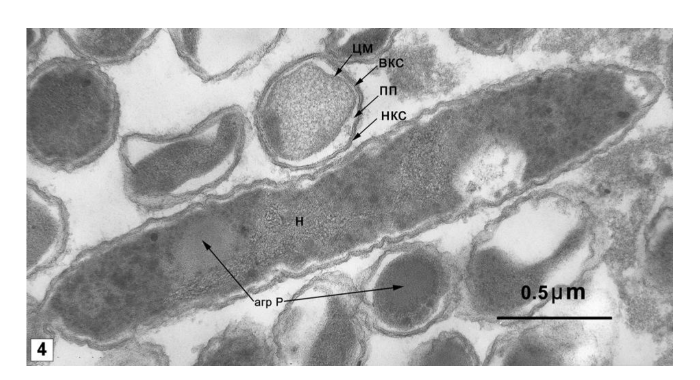
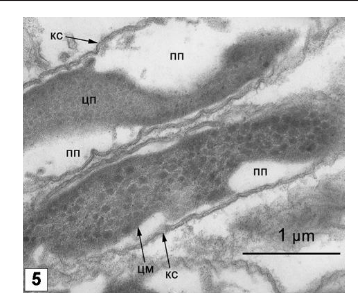


Рис. 4-11. Метод ультратонких срезов.

Рис. 4. Штамм «12TSK630501». Продольные и поперечные срезы бактериальных клеток.

подготовленных методом НК (рис. 3) можно проследить картину процесса изменения ПП клеток фузобактерий. По мере роста клеток происходит неравномерное увеличение ПП (рис. 5) во внутреннюю часть клетки, при этом ширина перипласта достигает 0,1 - 0,2 мкм. Изменения начинаются на дистальных участках палочковидных микроорганизмов, затем затрагивают и центральные участки клеток. В ПП чередуются участки электроннопрозрачного вещества и мелкогранулярного материала средней электронной плотности. В некоторых клетках ПП полностью заполнено материалом средней электронной плотности. На микрофотографиях можно наблюдать процесс выделения веществ из ПП через клеточную стенку в окружающую микроорганизмы среду (рис. 3). На ультратонких срезах вокруг бактериальных клеток об-



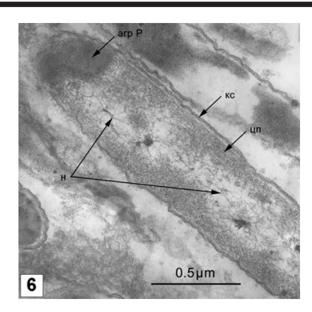


Рис. 5. Штамм «12TSK630501». Бактериальные клетки с измененным периплазматическим пространством.
Рис. 6. Штамм «12TSK630501». Нуклеоид и агрегат рибосом.

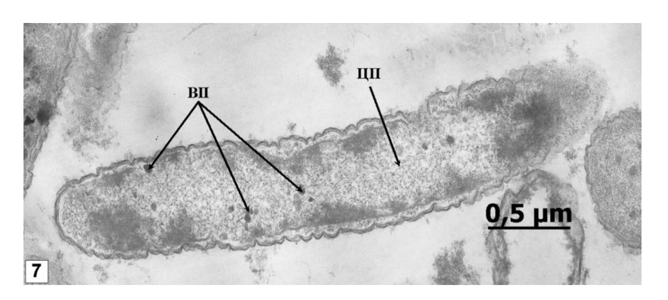
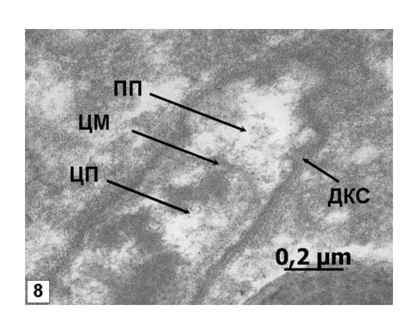


Рис. 7. Штамм «8TS630501». Клетка с разбросанными по цитоплазме осмиофильными включениями II типа.



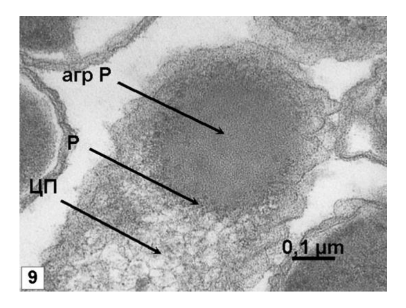


Рис. 8. Штамм «12TSK630501». Участок клетки с дефектом клеточной стенки.
Рис. 9. Штамм «12TSK630501». Участок цитоплазмы с гомогенным содержимым в центральной области окруженный рибосомами (агрегат рибосом).

наруживается вещество подобной структуры, которое удерживается даже после методической обработки образцов. Клеточная стенка таких клеток практически на всем протяжении не меняет своей структуры. Иногда наружная оболочка выглядит размытой и в некоторых местах (рис. 8) обнаруживаются разрывы (дефекты) клеточной стенки (ДКС). Встречаются протопласты в культуре обоих штаммов.

Нуклеоид. В зоне нуклеоида (рис. 6) отчетливо просматриваются нити ДНК. Цитоплазма в области нуклеоида имеет среднюю электронную плотность, мало рибосом, полисом и полностью отсутствуют включения.

Цитоплазма. Ультраструктура цитоплазмы фузобактерий очень гетероморфна. Гиалоплазма характеризуется высокой электронной плотностью и наличием мелкогранулярных компонентов.

Для цитоплазмы характерно наличие большого количества включений и гранул. Можно выделить два типа клеток штамма

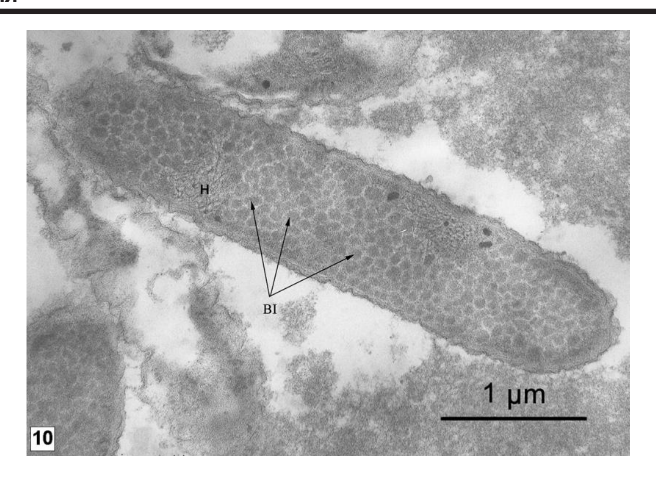


Рис. 10. Штамм «12TSK630501». Бактериальная клетка с цитоплазмой заполненной гомогенными зернами. Включения I типа.

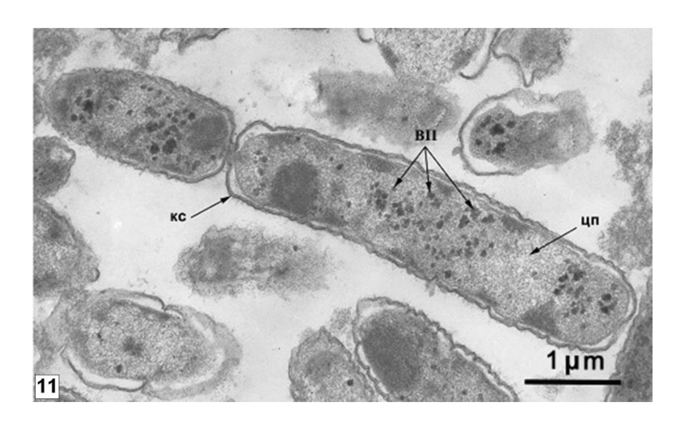


Рис. 11. Штамм «12TSK630501». Клетка в цитоплазме, которой отмечаются осмиофильные включения II типа.

Условные обозначения:

Агр Р – агрегат рибосом; ДКС – дефект клеточной стенки;
BI – включения 1-го типа; BII – включения 2-го типа;
ВКС – внутренний слой клеточной стенки; КС – клеточная стенка;
НКС - наружная мембрана клеточной стенки; Н – нуклеоид;
ПП – периплазматическое пространство; ЦП – цитоплазма;
ЦМ – цитоплазматическая мембрана, Р - рибосомы

«12TSK630501» с разными гранулами. Первый тип (рис. 9) – цитоплазма насыщена гомогенными гранулами средней плотности, округлой формы размером 50 - 60 нм. Они равномерно заполняют всю цитоплазму клетки, оставляя свободной область нуклеоида. Для второго типа клеток (рис. 10) характерно наличие в цитоплазме плотных осмиофильных зерен неправильной формы размерами от 30 до 60 нм, которые располагаются в цитоплазме группами.

Цитоплазма средней электронной плотности отмечается у клеток штамма

штамма «8TS630501», встречается осмиофильная зернистость (50 до 90 нм) локализованная в отдельных участках (рис. 7).

В цитоплазме клеток обоих штаммов выделяется область с гомогенным содержимым, не окруженная мембраной, достаточно крупных размеров 0,2 - 0,3 мкм в диаметре (рис. 4, 5, 9). Эти образования

по форме округлые, их можно видеть чаще в терминальных областях клетки. Эти структуры оказываются очень плотными, по сравнению с другими компонентами клетки, и также хорошо просматриваются на препаратах, полученных методом НК (рис. 1, 2). По периферии такой области, заполненной гомогенным веществом средней электронной плотности, в большом количестве располагаются рибосомы (25 нм) и полирибосомы. Такой агрегат рибосом, скорее всего, принимает участие в синтезе многочисленных включений цитоплазмы.

В фузобактериях с измененной формой перипласта отмечается уплотнение цитоплазмы, но при этом клетка выглядит функционально активной, просматривается нуклеоид, агрегат рибосом, сохраняются все виды зернистости. Общий размер клетки практически не меняется (рис. 4, 5).

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно литературным данным [1,2] световая микроскопия выявляет полиморфность клеток F. necrophorum – нитевидные формы, палочки разной длины с веретенообразным или колбовидным расширением, кокки и ряд др. При электронно-микроскопическом исследовании ультратонкого строения бактерий F. necrophorum штаммов «8TS630501» и «12TSK630501» нами обнаружены палочковидные бактерии различной длины с гладкой наружной поверхностью. Наши исследования согласуются с данными Garcia; Mangan; Bolstad с соавт. [5, 8, 4], в исследованиях которых нити и веретенообразные расширения также не обнаружены. Во всех описываемых случаях бактериальные клетки имели палочкообразную форму различной длины.

В наших исследованиях показано, что КС имеет план строения идентичный всем грамотрицательным бактериям. Необходимо заметить, что химическая структура клеточной стенки рассматриваемого вида бактерий была описана в 1993 Hermansson с соавт. [7]. В представленном материале авторы показали состав О-антигена вирулентного фактора фузобактерий (специфический полисахаридный компонент ЛПС) в составе наружной мембраны клеточной стенки.

На ультратонких срезах нами выявлен процесс морфологического изменения периплазматического пространства клеток фузобактерий во время роста. В периплазме находится много различных белков, в том числе и белки, участвующие в метаболизме. Считается, что периплазматическое пространство является «местом созревания» этих белков, которое во многом напоминает эндоплазматический ретикулум в клетках эукариот, поскольку там существует окислительная среда и происходит созревание белков [3]. Кроме того, у бактерий Fusobacterium necrophorum штаммов «8TS630501» и «12TSK630501» выявлена разнообразная зернистость цитоплазмы. Возможно, обнаруженные нами включения являются местом накопления неактивных белковых молекул (токсических веществ), а затем процесс продолжается в периплазматическом пространстве, где и происходит созревание этих молекул. Токсины могут постепенно проникать через поры в клеточной стенке, или через разрывы в клеточной стенке бактериальной клетки. В работе Garcia [6] отмечены аденил-киназы, глутамат-дегидрокиназы и лактат-дегидрокиназы мигрировавшие в окружающую среду.

В культурах обоих штаммов мы обнаружили клетки с ДКС. В работе Johnson [9] показано нарушение клеточной стенки и образование сферопластов фузобактерий при наличии в среде трансиндуцирующего агента (4,096 мкг цефокситина на мл). Обнаруженные в культуре клетки с ДКС позволяют предположить о повышенной устойчивости и вирулентности изучаемых нами Fusobacterium necrophorum.

Авторы выражают благодарность доктору медицинских наук, Диденко Любови Васильевне, заведующей лабораторией анатомии микроорганизмов института эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи РАМН за полезные консультации.

Резюме: Некробактериоз – широко распространенное во всем мире инфекционное заболевание, вызываемое видом Fusobacterium necrophorum. Опасность некробактериоз представляет для крупного рогатого скота, северных оленей, в то же время к этому заболеванию восприимчивы и многие виды домашних и диких животных, человек. Некробактериоз является существенной причиной экономического ущерба в скотоводстве.
Возбудитель заболевания Fusobacterium necrophorum, относится к грамотрицательным, неспорообразующим, анаэробным бактериям семейства Bacteroidaceae. Данные об ультраструктур-

ной организации F. necrophorum немногочисленны. Цель настоящего исследования: изучить ультраструктурную организацию двух штаммов фузобактерий для дальнейшего изучения действия антибактериальных препаратов.

SUMMARY
Necrobacteriosis is widely spread transmittable disease affecting cattle herds. The disease causative agent Fusobacterium necrophorum is gram-negative nonspore-forming anaerobic bacteria belonging to Bacteroidaceae family. For electron-microscope study 2 Fusobacterium necrophorum strains - «8 TS630501» and «12TSK630501» were selected for study involving negative contrast and ultrathin cultures section. The cells were observed to have rod-like shape with various length and the cell walls have smooth surface without any flagella and other cell damages. The cell walls have the construction peculiar to all gram-negative bacteria. Some cellular regions had gaps – cell wall deficiencies. The investigations provide morphological process of fusobacteria cell paraplasma spaces during growth process. Cytoplasma around nucleoide has medium electronic density with few ribosomes, polysomes and complete absence of inclusions.

Keywords: electronic microscopy, ultrathin sections method, negative contrasting, necrobacteriosis, Fusobacterium necrophorum.

Литература

1. Самоловов А.А., Кечин В.П., Лайшев К.А. Изучение и состояние проблемы некробактериоза северных оленей // Новосибирск. - Изд-во «Ревик-К». - 2001. – 178 с.
2. Соломаха О.И. Кириллов Л.В., Павлова И.Б. Некоторые морфологические особенности Fusobacterium necrophorum // Аграрная Россия. – 2000. – N. 3. - С. 59-61.
3. Эррингтон Д. Биология прокариотической клетки. Д. Эррингтон, М.Чепмен, С.Д. Халтгрен, М. Кэперон. В кн.: Клетки.- Под ред. Б. Льюин.- 2011. - С. 801-866.
4. Bolstad A.I., Jensen H.B., Bakken V. Taxonomy, Biology, and Periodontal Aspects of Fusobacterium nucleatum //Clin. Microbiol. Rev. – 1996. – V. 9. – P. 55-71.
5. Garcia M.M., Becker S.A.W.E., Brooks B.W., Berg J.N., Finegold S. M. Ultrastructure and Molecular Characterization of Fusobacterium necrophorum Biovars // Can.J.Vet.Res. – 1992. - V. 56. - P. 318-325.
6. Garcia M.M., Charlton K.M., McKay K.A Characterization of endotoxin from Fusobacterium necrophorun // Infect Immun. -1975.-V.-11.-N2-.P.371–379.
7. Hermansson K., Perry M.B., Altman E., Brisson J.-R., Garcia M.M. Structural studies of the O-antigenic polysaccharide of Fusobacterium necrophorum // Eur. J. Biochem. -1993, - V. 212 - P. 801-809.
8. Mangan D.F., Novak V.J., Vora S.A., Mourad J., Kriger P.S. Lectinlike Interactions of Fusobacterium nucleatum with Human Neutrophils // Infect Immun. - 1989. - V. 57. - N. 11. - P. 3601-3611.
9. Johnson C.C., Wexler H.M., Becker S., Garcia M. Cell-Wall-Defective Variants of Fusobacterium // Antimicrob. Agents and Chemother. – 1989. - V. 33. - P. 369-372
10. Терехов В.И., Кравченко В.М., Крамарь П.В. Патохимические и патоморфологические изменения в организме коров при некробактериозе. – Краснодар. – Ветеринария Кубани, № 3, 2011. – с. 11-13.

Контактная информации об авторах для переписки

Сальникова Марина Михайловна, ведущий инженер сектора электронной микроскопии ФГБУ «ФЦТРБ - ВНИВИ». E-mail: m_salnikova@mail.ru;

Саитов Вадим Расимович, к.в.н, заведующий сектором электронной микроскопии ФГБУ «ФЦТРБ - ВНИВИ»;

Рахматуллин Ирек Флюсович, ведущий инженер сектора электронной микроскопии ФГБУ «ФЦТРБ – ВНИВИ».

Хузин Дамир Абдулхаевич, к.в.н, заведующий лабораторией биотехнологии ФГБУ «ФЦТРБ – ВНИВИ».

Макаев Харис Нуртдинович, доктор ветеринарных наук, Заслуженный деятель науки Республики Татарстан, заведующий отделом биологической безопасности ФГБУ «ФЦТРБ – ВНИВИ».